

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：21590767

研究課題名（和文） 長期飢餓ストレスがタンパク発現調節因子(miRNA)に及ぼす影響

研究課題名（英文） microRNA alteration under chronic starvation stress

研究代表者

高倉 修 (TAKAKURA SHU)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40532859

研究成果の概要（和文）：

40%食餌制限マウス(9週齢雌 BALB/c)は、経時的な体重減少を認めた。摘出した海馬よりRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行ったところ、複数のマイクロRNA(miRNA)が対照と比較して有意に発現増加または低下している事が判明した。

その後の解析では miR-7 が飢餓ストレスにより上昇していた。標的解析では、多数の mRNA が候補として存在し、神経の発育などに関連しているものが含まれた。

飢餓により、多くの miRNA が発現変化する事は、未だ報告がない。これらの発見が飢餓状態(神経性食欲不振症など)の新たなバイオマーカーとしての役割を担う可能性も考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We used 9 week BALB-c mice. We found 40% restriction group was best suited for a model of chronic staving stress model and for further examinations. Microarray analysis using total RNA from mouse hippocampus revealed that expressions of several miRNAs were significantly altered under starvation stress condition compared to control group. In the real-time PCR analysis, miR-7 was significantly up-regulated. One of the putative targets for miR-7 was the mRNA which codes proteins related to neurogenesis and so on.

There have been no reports that many miRNA altered under chronic starvation stress. Those findings might contribute to establish a new biomarker of starvation conditions such as anorexia nervosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	210000	63000	273000
2010年度	90000	27000	117000
2011年度	50000	15000	65000
年度			
年度			
総計	350000	105000	455000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：miRNA、タンパク、マイクロアレイ、神経性食欲不振症、長期飢餓ストレス

1. 研究開始当初の背景

研究担当者はこれまで、甲状腺未分化癌細胞においてタンパク発現調節因子 miRNA をマイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行ってきた。その結果、甲状腺未分化癌に特異的に高発現する miRNA クラスタを同定し、それらが RB1 などの腫瘍抑制タンパクを抑制制御することにより癌の増殖に寄与している可能性を示してきた。

(1)miRNA とは

miRNA 遺伝子は、染色体上の不安定領域に多くは存在すると言われている。miRNA は 20 塩基程度の小さな RNA であり、メッセンジャー RNA に相補的に結合する事により、その翻訳を抑制あるいは阻害する事により、タンパク発現を制御している。即ち、セントラルドグマ以外で、細胞の振る舞いを規定するあらたな物質である。1990 年に線虫において報告されて以来、これまでに 500 種類以上の miRNA が報告されており、驚くべき事にその多くが種を超えて配列が保存されている。おそらくヒトにおいては約 1000 もの miRNA が存在し、遺伝子のエピジェネティックな制御に重要な役割を示している事が考えられている。Johnson らは、ras 遺伝子の 3'-UTR 領域が let-7 というマイクロ RNA の相補配列を複数有し、let-7 が RAS 発現を制御していることを発見した。肺癌では、let-7 の発現が低下することにより RAS 発現が増加し、癌化のシグナルを増強しているという。また、様々なストレス（寒冷ストレス、拘束ストレス、リン欠乏など）により miRNA の発現異常が出現したり、近

年多数報告されてきている。また、薬剤の感受性にも影響を与える因子としての役割も報告されつつある。

(2)摂食障害の発症に関する遺伝子の関与は、近年セロトニン、グレリン等について、幾つか報告があるが、未だ決定的な因子は見いだせていないのが現状である。それはこの疾患が環境や社会的因子が強く影響する多因子疾患である事が要因として考えられる。それ以外について我々は低栄養による遺伝子の不安定性が関与しているという仮説を立てた。我々は、臨床場面において、low T3 症候群やセロトニン低下をはじめとする、様々な内科的異常を経験してきた。また、近年うつ状態に対して、セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)が頻用されるようになってきたが、神経性食欲不振症などの低栄養、低体重状態の患者に対しては効果が乏しい症例も少なくない。しかしながら、それらの異常は、単に栄養不足だけでは説明できないものも多く存在し、そのメカニズムが明らかとなっているものは極めて少ないのが現状である。近年神経性食欲不振症患者においておいては DNA のメチル化異常が生じている(7)との報告がなされた。即ち、神経性食欲不振症患者においては遺伝子の不安定性が増加している可能性が考えられ、飢餓ストレスによりこうした不安定領域に存在する遺伝子発現異常が起こりうることを想定させるものであり、その現象が病態の悪循環を形成している事が考えられる。研究担当者らは、神経性食欲不振症で認められる慢性的な飢餓ストレスが miRNA の発現を変

化させエピジェネティックな遺伝子制御をもたらす事が、こうしたメカニズムの一端を担っている可能性があるとする着想に至った。

2. 研究の目的

飢餓ストレスがもたらす miRNA の発現変化を同定し、その標的タンパクを探索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

< 飢餓マウスモデルの作成 (Diet restriction 法) >

(1) BALB-c マウスを購入し、動物実験施設で飼育し、継代した。

(2) 8-10 週齢の雌マウスを実験に使用した。

(3) 一日の餌の摂取量を算出した。

(4) A 群: コントロール 100% 餌摂取、B 群: 40% 餌制限、C 群: 50% 餌制限、D 群: 60% 餌制限に分けた。

(5) 約 18 日間にわたりそれぞれの餌制限を行う。

(6) モデルマウスおよびコントロールマウスの脳海馬から mirVana miRNA Isolation Kit を用いて total RNA を抽出し -80°C 保存し、後の実験に使用した。

・ miRNA マイクロアレイによる miRNA の網羅的解析

上記の RNA を用いて、miRNA に対してマイクロアレイ (東レ製) を用い、発現の網羅的解析 (プロファイリング) を行った。

< リアルタイム RT-PCR 法を用いた miRNA の発現確認 >

miRNA は 20 塩基と非常に短い配列を持っており、配列相同性の高いものも多く存在する。これを克服するために TaqMan miRNA Assay Kit を用いて発現の確認を行った。

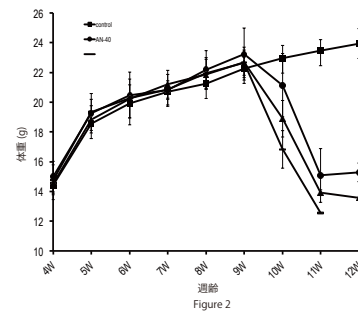
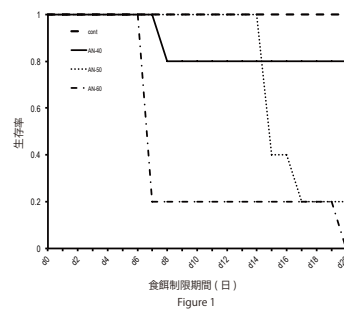
< マイクロ RNA のターゲット遺伝子の検索 >

同定した miRNA のターゲット遺伝子を Target scan を用いて検索した。

4. 研究成果

< 飢餓モデルマウスの作成 >

Figure1 のように、1 日食餌量を 50% 以上制限するとマウスの死亡率が高まり、実験への使用が困難である事が判明した。Figure2 のように 40% 食餌制限であれば、死亡率は低く、十分な体重減少が得られる。したがって、40% 食餌制限群を長期飢餓ストレスモデルに用いる事とした。



< マイクロアレイ法を用いたマウス海馬における miRNA 発現の網羅的解析 >

Table1、Table2 のようにマイクロアレイ法を用い、長期飢餓ストレスにより miRNA の発現が増加または低下する事を見いだした。それらは単独ではなく、多数存在し、かつ統計学的に有意であった。中でも miR-1 が最も発現低下し、miR-7 が最も発現上昇していた。

Table 1 Up-regulated miRNAs

miRNAs	Fold Change
miR-7b	1.65
miR-1894-3p	1.47
miR-7c	1.44
miR-466a-3p	1.44
miR-137	1.43
miR-451	1.34
miR-714	1.33
miR-744	1.33
miR-29b	1.29
miR-191	1.27

P<0.05

Table 2 Down-regulated miRNAs

miRNAs	Fold Change
miR-1	0.85
miR-31*	0.56
miR-466c	0.59
miR-877	0.72
miR-197	0.73
miR-466a-3p	0.75
let-7a	0.77
miR-692	0.82
miR-1937b	0.83
miR-466b	0.85

P<0.05

<TaqMan microRNA assays を用いた miRNA の定量>

マイクロアレイで最も発現が上昇あるいは低下していた miR-7、miR-1 をリアルタイム PCR-法を用いて発現の確認をしたところ、Figure 3、4 に示すように飢餓ストレスにより miR-7 が 1.7 倍程度発現上昇する事が確認された。

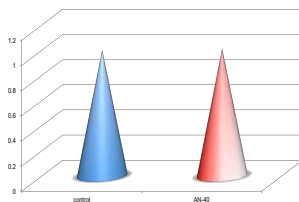


Figure 3 Expression of miR-1(n=3/each group)

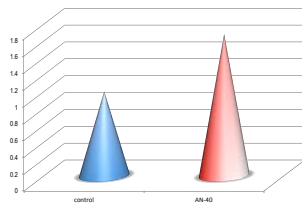


Figure 4 Expression of miR-7(n=3/each group)

<ターゲット mRNA の検索>

Target Scan を用いて、miRNA の予測されるターゲットの検索をおこなったところ、神経活動や神経発育に重要なタンパクの mRNA である可能性が考えられた。

miRNA	Putative target mRNA
miR-1	BDNF, H1AT1, IGF-1 etc.
miR-7	SNCA, RB1, IRS2 etc.

Table 3 Putative target of miRNAs

以上のように、飢餓により、予想以上に多く

の miRNA が発現変化する事は、未だ報告がない。これらの発見は飢餓状態(神経性食欲不振症など)の新たなバイオマーカーの開発の観点からも重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 高倉 修、河合 啓介、瀧井 正人、須藤 信行

長期飢餓ストレスによるマウス海馬のマイクロ RNA(miRNA)発現異常

第 53 回日本心身医学会総会

2012.5.26 鹿児島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003595/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 修 (TAKAKURA SHU)

研究者番号: 80325521

(2) 研究分担者

河合 啓介 (KAWAI KEISUKE)

研究者番号: 80117100

(3) 連携研究者

()

研究者番号: